

PCT/JPC3/08488

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

03.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 7月17日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-207886  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-207886]

出願人 東洋鋼板株式会社  
Applicant(s):

REC'D 22 AUG 2003

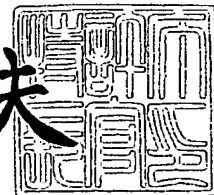
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3063356

【書類名】 特許願

【整理番号】 P4145

【提出日】 平成14年 7月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼鋳株式会  
社 技術研究所内

    【氏名】 岡村 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼鋳株式会  
社 技術研究所内

    【氏名】 丹花 通文

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼鋳株式会  
社 技術研究所内

    【氏名】 山野 博文

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県下松市東豊井 1 2 9 6 番地の 1 東洋鋼鋳株式会  
社 技術研究所内

    【氏名】 大場 光芳

【特許出願人】

    【識別番号】 390003193

    【氏名又は名称】 東洋鋼鋳株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0206808

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 静電層を有する固体支持体及びその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板上に、核酸分子を静電的に引き寄せるための静電層、及び核酸分子と共有結合しうる官能基を有する固体支持体。

【請求項 2】 基板の表面がダイヤモンド、軟ダイヤモンド、炭素系物質及び炭化物から選ばれる少なくとも 1 種で表面処理されている請求項 1 に記載の固体支持体。

【請求項 3】 静電層が、基板と共有結合していないアミノ基含有化合物を含む請求項 1 又は 2 に記載の固体支持体。

【請求項 4】 静電層が、基板と共有結合しているアミノ基含有化合物で構成され、該アミノ基含有化合物が、基板と結合していない側の末端にアミノ基を有する請求項 1 又は 2 に記載の固体支持体。

【請求項 5】 基板上に、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物及び炭素化合物を蒸着させた後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入して得られる請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の固体支持体。

【請求項 6】 基板を、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物を含有する溶液中に浸漬した後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入して得られる請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の固体支持体。

【請求項 7】 非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物がポリアリルアミンである請求項 6 に記載の固体支持体。

【請求項 8】 核酸分子が DNA である請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の固体支持体。

【請求項 9】 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の固体支持体に核酸分子が固定化されてなる固定化核酸分子。

【請求項 10】 基板上に、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物及び炭素化合物を蒸着させた後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することを特徴とする固体支持体の製造方法。

【請求項 11】 基板を、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物

を含有する溶液中に浸漬した後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することとを特徴とする固体支持体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA等を固定化するための支持体及び固定化核酸分子に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、DNAの増幅反応等においては、目的とするDNAを特定量得るために、1)二本鎖DNAの水素結合をほどくために試料の温度を95℃に上昇させる、2)次いでDNAを複製するためのプライマーと再結合させるために試料の温度を45℃に下降させる、3)更に耐熱性ポリメラーゼによりプライマーを伸長させてDNAを複製させるために試料の温度を74℃に上昇させる、といった1)～3)のヒートサイクルを幾度も繰り返す必要があった。このようなDNAの増幅反応では、試料を合成樹脂の容器などに入れ、この容器をアルミニウムブロックに収容し前記ヒートサイクルを行っていた。

しかし、前記ヒートサイクルは多大な時間がかかり、目的とする量のDNAを得るには数時間を要していた。また、温度制御の精度が低いために、目的とする以外のDNAも複製されるという問題もあった。

【0003】

このような問題に鑑み、DNAを容易に固定化できて、DNA増幅反応によりDNAを複製するために適する支持体として、基板の表面に、表面処理層、及び核酸分子と共有結合しうる官能基を有する化学修飾層を順次設けてなる固体支持体が開発されている（例えば、WO00/22108、WO02/12891、特開2002-82116）。

しかしながら、前記固体支持体のDNAの固定化量は、必ずしも充分とはいえず、DNAの固定化量のより高い固体支持体の出現が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、核酸分子の固定化量のより高い固体支持体を提供することである。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討の結果、基板上に、核酸分子と共有結合しうる官能基を有する固体支持体に、更に核酸分子を静電的に引き寄せるための静電層を設けることにより、核酸分子の固定化量が著しく向上することを見出し本発明を完成するに至った。

#### 【0006】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 基板上に、核酸分子を静電的に引き寄せるための静電層、及び核酸分子と共有結合しうる官能基を有する固体支持体。

(2) 基板の表面がダイヤモンド、軟ダイヤモンド、炭素系物質及び炭化物から選ばれる少なくとも1種で表面処理されている前記(1)に記載の固体支持体。

(3) 静電層が、基板と共有結合していないアミノ基含有化合物を含む前記(1)又は(2)に記載の固体支持体。

#### 【0007】

(4) 静電層が、基板と共有結合しているアミノ基含有化合物で構成され、該アミノ基含有化合物が、基板と結合していない側の末端にアミノ基を有する前記(1)又は(2)に記載の固体支持体。

(5) 基板上に、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物及び炭素化合物を蒸着させた後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入して得られる前記(1)～(3)のいずれかに記載の固体支持体。

(6) 基板を、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物を含有する溶液中に浸漬した後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入して得られる前記(1)～(4)のいずれかに記載の固体支持体。

#### 【0008】

(7) 非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物がポリアリルアミンである前記(6)に記載の固体支持体。

(8) 核酸分子がDNAである前記(1)～(7)のいずれかに記載の固体支持体。

(9) 前記(1)～(8)のいずれかに記載の固体支持体に核酸分子が固定化されてなる固定化核酸分子。

#### 【0009】

(10) 基板上に、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物及び炭素化合物を蒸着させた後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することを特徴とする固体支持体の製造方法。

(11) 基板を、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物を含有する溶液中に浸漬した後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することを特徴とする固体支持体の製造方法。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に用いる基板の材料としては、例えば、シリコン、ガラス、繊維、木材、紙、セラミックス、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂(Acrylonitrile Butadiene Styrene 樹脂)、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂）が挙げられる。

#### 【0011】

基板の材料として前記のものをを用いる場合には、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入するための化合物を基板上に強固に固定化するために、表面処理を施すことが好ましい。

#### 【0012】

表面処理には、合成ダイヤモンド、高圧合成ダイヤモンド、天然ダイヤモンド、軟ダイヤモンド（例えば、ダイヤモンドライクカーボン）、アモルファスカーボン、炭素系物質（例えば、グラファイト、フラーレン、カーボンナノチューブ）のいずれか、それらの混合物、又はそれらを積層させたものをを用いることが好ましい。また、炭化ハフニウム、炭化ニオブ、炭化珪素、炭化タンタル、炭化ト

リウム、炭化チタン、炭化ウラン、炭化タングステン、炭化ジルコニウム、炭化モリブデン、炭化クロム、炭化バナジウム等の炭化物を用いてもよい。ここで、軟ダイヤモンドとは、いわゆるダイヤモンドライクカーボン（DLC: Diamond Like Carbon）等の、ダイヤモンドとカーボンとの混合体である不完全ダイヤモンド構造体を総称し、その混合割合は、特に限定されない。

#### 【0013】

表面処理された基板の一例としては、スライドガラスに軟ダイヤモンドを製膜した基板が挙げられる。このような基板は、ダイヤモンドライクカーボンが、水素ガス 0～99 体積%、残りメタンガス 100～1 体積%を含んだ混合ガス中で、イオン化蒸着法により作成したものであることが好ましい。

表面処理層の厚みは、1 nm～100  $\mu$ m であることが好ましい。

#### 【0014】

基板の表面処理層の形成は、公知の方法、例えば、マイクロ波プラズマ CVD (Chemical Vapor Deposit) 法、E C R C V D (Electric Cyclotron Resonance Chemical Vapor Deposit) 法、I P C (Inductive Coupled Plasma) 法、直流スパッタリング法、E C R (Electric Cyclotron Resonance) スパッタリング法、イオンプレーティング法、アークイオンプレーティング法、E B (Electron Beam) 蒸着法、抵抗加熱蒸着法、イオン化蒸着法、アーク蒸着法、レーザ蒸着法などにより行うことができる。

#### 【0015】

本発明に用いる基板としては、前記のように表面処理層を形成した構造だけでなく、合成ダイヤモンド、高圧合成ダイヤモンド、天然ダイヤモンド、軟ダイヤモンド（例えば、ダイヤモンドライクカーボン）、アモルファスカーボン；金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン等の金属；プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS 樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂）；前記金属粉末、セラミック粉末等に、前記樹脂をバインダーとして混合、結合形成したもの；前記金属粉末やセラミックス粉末等の原料をプレ



ス成形機で圧粉したものを高温で焼結したものが挙げられ、また、前記の材料の積層体や複合体（例えば、ダイヤモンドと他の物質との複合体、（例えば2相体））であってもよい。

#### 【0016】

基板の形状及びサイズは特に限定されないが、形状としては、平板状、糸状、球状、多角形状、粉末状などが挙げられ、サイズは、平板状のものをを用いる場合、通常は、幅0.1～100mm、長さ0.1～100mm、厚み0.01～10mm程度である。

#### 【0017】

また、基板の表面又は裏面に、反射層としてTi、Au、Pt、Nb、Cr、TiC、TiN等の単層又はこれらの複合膜を製膜してもよい。反射層の厚みは、全体に均一であることが必要なため、好ましくは10nm以上、更に好ましくは100nm以上である。

#### 【0018】

基板としてガラスを用いる場合、その表面は、Ra（JIS B 0601）で1nm～1000nmの範囲で意図的に粗面化されていることも好ましい。このような粗面化表面は基板の表面積が増えて、多量のDNAプローブ等を高密度で固定化できる点で好都合である。

#### 【0019】

本発明の固体支持体には、核酸分子を静電的に引き寄せるために静電層が設けられている。

静電層としては、核酸分子を静電的に引き寄せ、核酸分子の固定化量を向上させるものであれば、特に制限はないが、例えば、アミノ基含有化合物など正荷電を有する化合物を用いて形成することができる。

#### 【0020】

前記アミノ基含有化合物としては、非置換のアミノ基（ $-NH_2$ ）、又は炭素数1～6のアルキル基等で一置換されたアミノ基（ $-NHR$ ；Rは置換基）を有する化合物、例えばエチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、n-プロピルアミン、モノメチルアミン、ジメチルアミン、モノエチルアミン、ジエチルアミ

ン、アリルアミン、アミノアゾベンゼン、アミノアルコール（例えば、エタノールアミン）、アクリノール、アミノ安息香酸、アミノアントラキノン、アミノ酸（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、セリン、トレオニン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、プロリン、シスチン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギン、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、アニリン、又はこれらの重合体（例えば、ポリアリルアミン、ポリリシン）や共重合体；4,4',4"-トリアミノトリフェニルメタン、トリアムテレン、スベルミジン、スベルミン、プトレシンなどのポリアミン（多価アミン）が挙げられる。

静電層は、基板又は表面処理層と共有結合させずに形成してもよく、基板又は表面処理層と共有結合させて形成してもよい。

#### 【0021】

静電層を基板又は表面処理層と共有結合させずに形成する場合には、例えば、表面処理層を製膜する際に前記アミノ基含有化合物を製膜装置内に導入することによって、アミノ基を含有する炭素系皮膜を製膜する。また、表面処理層は、密着層を形成した後にアミノ基を含有する皮膜を形成するといった、複層であってもよい。

#### 【0022】

また、静電層を基板又は表面処理層と共有結合させずに形成する場合には、静電層と基板又は表面処理層との親和性、即ち密着性を高める点で、基板上に、前記の非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物及び炭素化合物を蒸着させた後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することが好ましい。ここで用いる炭素化合物としては、気体として供給することができれば特に制限はないが、例えば常温で気体であるメタン、エタン、プロパンが好ましい。蒸着の方法としては、イオン化蒸着法が好ましく、イオン化蒸着法の条件としては、作動圧が0.1～50Pa、そして加速電圧が200～1000Vの範囲であることが好ましい。

#### 【0023】

静電層を基板又は表面処理層と共有結合させて形成する場合には、例えば、基

板又は表面処理層を施した基板に、塩素ガス中で紫外線照射して表面を塩素化し、次いで前記アミノ基含有化合物のうち、例えば、ポリアリルアミン、ポリリシン、4,4',4"-トリアミノトリフェニルメタン、トリアムテレン等の多価アミンを反応させて、基板と結合していない側の末端にアミノ基を導入することにより、静電層を形成することができる。

#### 【0024】

また、静電層が施された基板に核酸分子と共有結合しうる官能基を導入する反応（例えば、ジカルボン酸又は多価カルボン酸を用いるカルボキシル基の導入）を溶液で行う場合には、基板を、前記の非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物を含有する溶液中に浸漬した後、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入することが好ましい。前記溶液の溶媒としては、例えば水、N-メチルピロリドン、エタノールが挙げられる。

#### 【0025】

静電層が施された基板に、ジカルボン酸又は多価カルボン酸を用いてカルボキシル基を導入する場合には、予めN-ヒドロキシスクシンイミド及び／又はカルボジイミド類で活性化させたり、あるいは、反応をN-ヒドロキシスクシンイミド及び／又はカルボジイミド類の存在下に行うことが好ましい。

#### 【0026】

基板を、非置換又は一置換されたアミノ基を有する化合物を含有する溶液中に浸漬することにより、静電層を形成する場合に、アミノ基含有化合物としてポリアリルアミンを用いると、基板との密着性に優れ、核酸分子の固定化量がより向上する。

静電層の厚みは、1 nm～500  $\mu$ mであることが好ましい。

#### 【0027】

前記のようにして、静電層を施した基板表面には、核酸分子と共有結合しうる官能基を導入するため、化学修飾を施す。

前記官能基としては、例えばカルボキシル基、活性エステル基、ハロホルミル基、水酸基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオール基、アミノ基が挙げられる。

## 【0028】

官能基としてカルボキシル基を導入するために用いられる化合物としては、例えば、式： $X-R^1-COOH$ （式中、 $X$ はハロゲン原子、 $R^1$ は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるハロカルボン酸、例えばクロロ酢酸、フルオロ酢酸、ブromo酢酸、ヨード酢酸、2-クロロプロピオン酸、3-クロロプロピオン酸、3-クロロアクリル酸、4-クロロ安息香酸；式： $HOOC-R^2-COOH$ （式中、 $R^2$ は単結合又は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるジカルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸；ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、トリメリット酸、ブタンテトラカルボン酸などの多価カルボン酸；式： $R^3-CO-R^4-COOH$ （式中、 $R^3$ は水素原子又は炭素数1～12の2価の炭化水素基、 $R^4$ は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるケト酸又はアルデヒド酸；式： $X-OC-R^5-COOH$ （式中、 $X$ はハロゲン原子、 $R^5$ は単結合又は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるジカルボン酸のモノハライド、例えばコハク酸モノクロリド、マロン酸モノクロリド；無水フタル酸、無水コハク酸、無水シュウ酸、無水マレイン酸、無水ブタンテトラカルボン酸などの酸無水物が挙げられる。

## 【0029】

前記のようにして導入されたカルボキシル基は、シアナミドやカルボジイミド（例えば、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド）などの脱水縮合剤とN-ヒドロキシスクシンイミドなどの化合物で活性エステル化することができる。

## 【0030】

官能基としてハロホルミル基を導入するために用いられる化合物としては、例えば、式： $X-OC-R^6-CO-X$ （式中、 $X$ はハロゲン原子、 $R^6$ は単結合又は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す。）で示されるジカルボン酸のジハライド、例えばコハク酸クロリド、マロン酸クロリドが挙げられる。

官能基として水酸基を導入するために用いられる化合物としては、例えば、式： $HO-R^7-COOH$ （式中、 $R^7$ は炭素数1～12の2価の炭化水素基を表す

。)で示されるヒドロキシ酸又はフェノール酸が挙げられる。

官能基としてアミノ基を導入するために用いられる化合物としては、例えばアミノ酸が挙げられる。

#### 【0031】

前記の化合物は、そのカルボキシル基が静電層のアミノ基と縮合してアミド結合を形成する。

前記の化合物のうち、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、トリメリット酸、ブタンテトラカルボン酸などの多価カルボン酸は親水性を向上させるために使用することもできる。

#### 【0032】

本発明の支持体には、DNA、RNAのいずれの核酸分子も固定化することができる。DNA、RNAの塩基数は、通常1～200、好ましくは5～150である。また、DNAは1本鎖、2本鎖のいずれも固定化することができる。

本発明の支持体は、例えば、DNAの増幅反応に用いることができる。更に、本発明の支持体を用い、末端水酸基又は末端カルボキシル基に、水素結合でオリゴ核酸の末端塩基を固定化し、更に、このオリゴ核酸と相補的塩基配列を有するDNAを固定して、DNAライブラリーチップとして用いることもできる。また、DNAの代わりに、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNAフラグメント等を固定化して、ライブラリーとすることもできる。

#### 【0033】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 基板に表面処理層を施すときにアミノ基含有化合物をチャンバーに導入(1)

25mm(幅)×75mm(長さ)×1mm(厚み)のスライドガラスに、イオン化蒸着法によって、メタンガス95体積%と水素5体積%を混合したガスを原料として、加速電圧0.5kVでDLC層を10nmの厚みに形成した。その後、メタンガスをキャリアーガスとして5cm<sup>3</sup>/分の割合で15℃に保温し

たエチレンジアミン中を通してチャンバーに導入した。作動圧を 2 Pa として加速電圧 0.5 kV でメタンとエチレンジアミンを原料として C、N 及び H からなる層を 10 nm の厚みに形成した。

#### 【0034】

その後、メタンとエチレンジアミンを原料として C、N 及び H からなる表面処理層のアミノ基に多価カルボン酸として無水ブタンテトラカルボン酸を縮合した後に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6) 300 ml に 0.1 M の 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドと 20 mM の N-ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に 30 分間浸漬することによって活性化した。

#### 【0035】

その後、0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l に調製した  $\lambda$  DNA を鋳型として PCR により増幅した 500 bp の Cy3 標識 2 本鎖 DNA 約 1 nl を、マイクロアレイ作成装置を用いて基板上にスポットした。その後、80℃のオーブンで 3 時間加熱後、2×SSC/0.2% SDS で洗浄した後に、スポットした DNA の蛍光強度を測定した。

その結果、蛍光強度は 36050 であった。更に、95℃の 2×SSC/0.2% SDS により洗浄した後に蛍光強度を測定すると、35540 と殆ど低下しなかった。

#### 【0036】

比較として、2 重量%の 3-アミノプロピルトリエトキシシランエタノール溶液にスライドガラスを 10 分間浸漬した後、取り出し、エタノールで洗浄後、110℃で 10 分間乾燥した。次に、このアミノ基が導入された基板に無水コハク酸を縮合した後に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6) 300 ml に 0.1 M の 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドと 20 mM の N-ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に 30 分間浸漬することによって活性化した。このようにして得た基板に、同様にして  $\lambda$  DNA を鋳型として PCR により増幅した 500 bp の Cy3 標識 2 本鎖 DNA を固定した後、2×SSC/0.2% SDS で洗浄したところ、蛍光強度は 23500 であった。

。更に、95℃の2×SSC/0.2%SDSにより洗浄した後に蛍光強度を測定すると、蛍光強度は23000とあまり低下しなかった。

即ち、静電層が殆どない共有結合タイプの基板によっては、DNAを共有結合により強固に固定できるが、蛍光シグナル強度が上がらなかった。

#### 【0037】

また、静電層を有しない基板（スライドガラスに5%ポリアクリル酸水溶液を塗布乾燥後、60分間紫外線照射して不溶化した。その後、0.1Mリン酸緩衝液（pH6）300mlに0.1Mの1-[3-（ジメチルアミノ）プロピル]-3-エチルカルボジイミドと20mMのN-ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に30分間浸漬することによって活性化した。）に同様にしてλDNAを鋳型としてPCRにより増幅した500bpのCy3標識2本鎖DNAを固定した後2×SSC/0.2%SDSで洗浄したところ、ポリアクリル酸塗膜の剥離が生じたが、残存した部位での蛍光強度は26220であった。更に、95℃の2×SSC/0.2%SDSにより洗浄すると、ポリアクリル酸塗膜は完全に剥離した。

#### 【0038】

（実施例2）基板に表面処理層を施すときにアミノ基含有化合物をチャンバーに導入（2）

25mm（幅）×75mm（長さ）×1mm（厚み）のスライドガラスに、イオン化蒸着法によって、メタンガスをキャリアーガスとして5cm<sup>3</sup>/分の割合で15℃に保温したエチレンジアミン中を通してチャンバーに導入した。作動圧を2Paとして加速電圧0.5kVでメタンとエチレンジアミンを原料としてC、N及びHからなる層を20nmの厚みに形成した。

#### 【0039】

その後、メタンとエチレンジアミンからなる表面処理層のアミノ基に多価カルボン酸としてポリアクリル酸を0.1Mの1-[3-（ジメチルアミノ）プロピル]-3-エチルカルボジイミドの存在下で縮合した後に、0.1Mリン酸緩衝液（pH6）300mlに0.1Mの1-[3-（ジメチルアミノ）プロピル]-3-エチルカルボジイミドと20mMのN-ヒドロキシスクシンイミドを溶解

した活性化液中に30分間浸漬することによって活性化した。

【0040】

その後、 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した $\lambda$  DNAを鋳型としてPCRにより増幅した500bpのCy3標識2本鎖DNA約1nlを、マイクロアレイ作成装置を用いて基板上にスポットした。その後、80℃のオーブンで3時間加熱した後、 $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ で洗浄した後に、スポットしたDNAの蛍光強度を測定した。

その結果、蛍光強度は34050であった。更に、95℃の $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ により洗浄した後に蛍光強度を測定すると、33500と殆ど低下しなかった。

【0041】

比較として、市販されている静電型基板（松浪硝子工業（株）製；スライドガラスにアミノシラン（シランカップリング剤）を塗布した基板）に同様に $\lambda$  DNAを鋳型としてPCRにより増幅した500bpのCy3標識2本鎖DNAを固定した後、 $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ で洗浄したところ、蛍光強度は35460であった。更に、95℃の $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ により洗浄した後に蛍光強度を測定すると、蛍光強度は26210にまで低下した。

【0042】

また、静電層を有しない基板（スライドガラスに5%ポリアクリル酸水溶液を塗布乾燥後、60分間紫外線照射して不溶化した。その後、0.1Mリン酸緩衝液（pH6）300mlに0.1Mの1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドと20mMのN-ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に30分間浸漬することによって活性化した。）に同様に $\lambda$  DNAを鋳型としてPCRにより増幅した500bpのCy3標識2本鎖DNAを固定した後 $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ で洗浄したところ、ポリアクリル酸塗膜の剥離が生じたが、残存した部位での蛍光強度は26220であった。更に、95℃の $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ により洗浄すると、ポリアクリル酸塗膜は完全に剥離した。

【0043】



(実施例 3) 後処理で静電層を形成

25 mm (幅) × 75 mm (長さ) × 1 mm (厚み) のスライドガラスに、イオン化蒸着法によって、メタンガス 95 体積% と水素 5 体積% を混合したガスを原料として、加速電圧 0.5 kV で DLC 層を 10 nm の厚みに形成した。

【0044】

その後、塩素ガス中で 30 分間紫外線照射して塩素化した。その後、ポリアミン水溶液 (0.1 g/l) に基板を浸漬して、静電層を形成した。

その後、静電層のアミノ基に多価カルボン酸としてポリアクリル酸を 0.1 M の 1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3- エチルカルボジイミドの存在下で縮合した後に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6) 300 ml に 0.1 M の 1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3- エチルカルボジイミドと 20 mM の N- ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に 30 分間浸漬することによって活性化した。

【0045】

その後、0.1 μg/μl に調製した λ DNA を鋳型として PCR により増幅した 500 bp の Cy3 標識 2 本鎖 DNA 約 1 nl を、マイクロアレイ作成装置を用いて基板上にスポットした。その後、80℃ のオーブンで 3 時間加熱した後に 2×SSC/0.2% SDS で洗浄した後に、スポットした DNA の蛍光強度を測定した。

【0046】

その結果、蛍光強度は 35000 であった。更に、95℃ の 2×SSC/0.2% SDS により洗浄した後に蛍光強度を測定すると、蛍光強度は 34500 と殆ど低下しなかった。

【0047】

比較として、DLC を 10 nm の厚みに形成したスライドガラスに、5% ポリアクリル酸水溶液を塗布乾燥後、60 分間紫外線照射して不溶化した。その後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6) 300 ml に 0.1 M の 1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3- エチルカルボジイミドと 20 mM の N- ヒドロキシスクシンイミドを溶解した活性化液中に 30 分間浸漬することによって活性化した

。同様にして $\lambda$  DNAを鋳型としてPCRにより増幅した500bpのCy3標識2本鎖DNAを固定した後、 $2\times\text{SSC}/0.2\%\text{SDS}$ で洗浄したところ、ポリアクリル酸塗膜が完全に剥離した。

【0048】

【発明の効果】

本発明の固体支持体は、従来の固体支持体よりも核酸分子を大量に固定化することができ、かつ共有結合により強固に固定化できることから、従来DNAアレイの課題であった検出感度と信頼性を改良することができるので、広くDNAアレイの普及を図ることが可能となる。

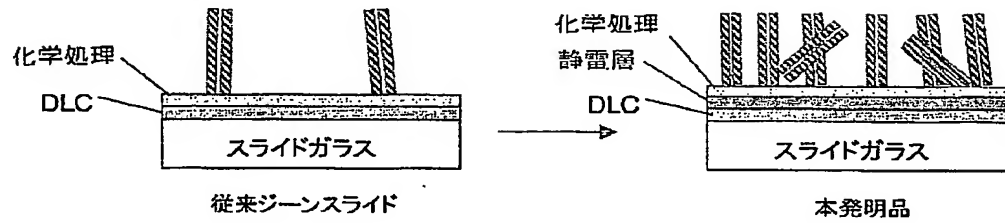
【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の固体支持体及び従来品の一例を示す模式図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸分子の固定化量の高い固体支持体を提供する。

【解決手段】 基板上に、核酸分子を静電的に引き寄せるための静電層、及び核酸分子と共有結合しうる官能基を有する固体支持体。

【選択図】 図1

特願 2002-207886

出願人履歴情報

識別番号

[390003193]

1. 変更年月日      2000年 3月27日  
[変更理由]      住所変更  
                    住 所      東京都千代田区四番町2番地12  
                    氏 名      東洋鋼鋳株式会社
  
2. 変更年月日      2003年 4月 2日  
[変更理由]      名称変更  
                    住所変更  
                    住 所      東京都千代田区四番町2番地12  
                    氏 名      東洋鋼鋳株式会社

EPO - Munich  
83  
27. Juni 2005

SEQUENCE LISTING

<110> Toyo Kohan Co., Ltd.

<120>SOLID SUPPORT HAVING ELECTROSTATIC LAYER AND USE THEREOF

<130>2037PCT

<150>JP 2002-207886

<151>2002-07-17

<150>JP 2002-275797

<151>2002-09-20

<160>2

<210>1

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400>1

gatgagttgt gtccgtacaa ct 22

<210>2

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400>2

ggttatcgaa atcagccaca gcgcc 25